



UNIVERSIDAD
NACIONAL
AUTÓNOMA DE
NICARAGUA,
MANAGUA
UNAN - MANAGUA

Instituto Politécnico de la Salud “Luis Felipe Moncada

Trabajo monográfico para optar al Título de:

Licenciatura en Bioanálisis Clínico

Título

Prevalencia del gen blaNDM en *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*, aislados de procesos infecciosos en paciente del Hospital Antonio Lenin Fonseca de la ciudad de Managua en el periodo de Junio a Octubre – 2017.

Autores

Br. Cinthia Guadalupe Medina Bermúdez.

Br. Johana de los Ángeles Muñoz Gutiérrez.

Br. Rodolfo Rafael Ortega Selva.

Tutor y Asesor:

MsC. Oscar Arbizú Medina.

Lic. BAC, MsC. Microbiología Médica.

Managua, Diciembre 2017

Dedicatoria

A Dios por darnos vida, la fuerza y la sabiduría.

A Nuestros padres por brindarnos todo su apoyo y su amor incondicional en el transcurso de esta larga jornada.

Agradecimientos

A Nuestro tutor y Asesor MsC. Oscar Arbizu Medina por dedicarnos su tiempo y brindarnos de sus conocimientos.

Al laboratorio de biología molecular de la UNAN-Managua, por toda la ayuda que nos brindaron en el transcurso de este estudio y en especial a la Lic. Kenia García Rosales.

Al Hospital Antonio Lenin Fonseca por su colaboración directa con materiales, para realización de este trabajo.

Glosario

A

ADN: Acido desoxirribonucleico

AMPc: Enzimas pertenecientes de forma natural en algunas enterobacterias y bacilos Gram-negativos, son capaces de resistir la inhibición por ácido clavulánico.

APB: Acido fenil borónico.

B

BLEE: Beta-lactamasa de espectro extendido

C

CEP: Cefalotina

CEC: Cefaclor

CRO: ceftriaxona

CIM: concentración mínima inhibitoria

CTX: Cefotaxima

CXM: cefuroxima

COL: Colistina

CHL: Cloramfenicol

D

DNTPS: desoxirribonucleótidos trifosfato

E

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

F

FOX: Cefoxotín

FEP: Cefepime

H

HALF: Hospital Antonio Lenin Fonseca

I

IMP: Imipenem

ITU: infecciones el tracto urinario

K

KPC: *Klebsiella pneumoniae*

Carbapemasa

KCN: cianuro de potasio

L

LPS: lipopolisacáridos

M

MBL: Metallo beta lactamasa

MEM: Meropenem

N

NDM: New Delhi Metallo Carbapenemasa.

O

OMS: Organización Mundial de la Salud

P

PBP: Proteína Fijadora de Penicilina

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

S

SMA: mercaptoacetato de sodio

T

TBE: Disolución tampón tris borato y EDTA.

TGH: transferencia genética horizontal

U

UCI: Unidad de Cuidados Intensivos.

Resumen

El presente estudio de tipo descriptivo de corte transversal, tuvo como objetivo conocer la prevalencia del gen blaNDM en *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*, aislados de procesos infecciosos en paciente del Hospital Antonio Lenin Fonseca de la ciudad de Managua en el periodo de Junio a Octubre – 2017, donde se estudiaron 152 cepas; El 64.48% fueron *E. coli* y 35.52% *K. pneumoniae*. Se encontró que 13 cepas eran resistentes a los carbapenémicos, 10 fueron *K. pneumoniae* y 3 *E. coli*, correspondiendo al 18.89% del universo, 12 de las 13 cepas dieron positivas para el test de sinergia con EDTA. Con el método genotípico para la determinación de blaNDM se encontró una prevalencia 4.86% de *K. pneumoniae* y 1.96% de *E. coli*.

En el perfil resistencia se encontró que las 13 cepas fueron resistentes a los antibióticos β -lactámicos; Cefalotina, Cefepime, Cefaclor, cefuroxima, ceftriaxona, Cefoxotín, Cefotaxima y también a los carbapenémicos Imipenem, meropenem, 12 cepas resultaron resistentes a Cloranfenicol y Gentamicina.

Índice

1.	Introducción	1
2.	Antecedentes	2
3.	Justificación.....	4
4.	Planteamiento del problema	5
5.	Objetivo general	6
6.	Marco teórico	7
6.1	Familia Enterobacteriaceae.....	7
6.1.1	Genero Klebsiella	7
6.1.2	Genero Escherichia.....	8
6.2	Agentes antimicrobianos.....	8
6.3	Mecanismos de resistencia.....	10
6.3.1	Resistencia natural.....	10
6.3.2	Resistencia adquirida.....	10
6.3.3	Transferencia genética horizontal.....	10
6.3.4	Mecanismos de Resistencia a los Antibióticos β -lactámicos	12
6.3.4.1	Alteración en las barreras de permeabilidad.....	12
6.3.4.2	Bombas de Eflujo.....	12
6.3.4.3	Modificación del sitio blanco.....	12
6.3.4.4	Modificación enzimática del antibiótico.....	13
6.3.5	Mecanismo de Resistencia de Klebsiella pneumoniae	13
6.3.6	Mecanismo de Resistencia Escherichia coli.....	13
6.4	Clasificación de las carbapenemasas	13
6.4.1	Metalo- β -lactamasa	14
6.5	New Delhi metalo-beta-lactamasa.	14
6.6	Detección de Carbapenemasas.....	14
6.6.1	Métodos fenotípicos	15
6.6.1.1	Kirby-Bauer	15
6.6.1.2	Test de sinergia con EDTA.....	16
6.6.2	Método Genotípico	17
6.6.2.1	Reacción en cadena de la polimerasa.....	17
7.	Diseño metodológico	20
8.	Operacionalización de variables.....	26
9.	Análisis y discusión de resultados.....	27
10.	Conclusiones	35
11.	Recomendaciones.....	36
12.	Bibliografía	37
	Anexos.....	42

1. Introducción

La resistencia bacteriana a antibióticos se ha convertido en una de las crecientes preocupaciones en salud pública, debido a que en las últimas décadas el uso excesivo de antibióticos, ha seleccionado de manera sucesiva clones bacterianos con mecanismos de resistencia cada vez más potentes, dificultando el tratamiento de infecciones ocasionadas por microorganismos multirresistentes. (Moncada M. 2014)

Las enterobacterias productoras de carbapenemasas son un subtipo de enterobacterias que son capaces de hidrolizar los antibióticos Carbapenémicos, se ha señalado también que con frecuencia la resistencia debida a carbapenemasas, se acompaña de resistencia a otros grupos de antibióticos, como Fluoroquinolonas, Trimetoprim Sulfamethoxazole y aminoglicósidos, lo que complica aún más el tratamiento de las infecciones causadas por estos agentes. Por lo que las infecciones por bacterias productoras de carbapenemasas se asocian a mayor estancia hospitalaria y mortalidad. También es importante mencionar que este tipo de resistencia, que es mediada por plásmidos, se puede transferir con mayor facilidad a otras enterobacterias, lo que facilita su rápida diseminación (INCIENSA 2014).

Nueva Delhi Metallo-beta-lactamasa (NDM) es una enzima que hace que las bacterias sean resistentes a una amplia gama de antibióticos β lactámicos. Estos incluyen los antibióticos de la familia carbapenem, que son un pilar para el tratamiento de infecciones bacterianas resistentes a los antibióticos. Desde el año 2009, cuando se realizó la detección del gen NDM en un ciudadano sueco que enfermó con una infección bacteriana resistente a los antibióticos que adquirió en la India, se ha ido documentando la diseminación de este mecanismo y su circulación en otros países. Este gen se transfiere muy fácilmente a otras bacterias y desde entonces han ido apareciendo en casos de infecciones producidas por bacterias que portan dicha resistencia. (HPA, 2009)

En los últimos años en Nicaragua se han identificado cepas con resistencia a los carbapenem, con mayor frecuencia de tipo Metallo- β -lactamasas, en así también estudio realizado en Nicaragua revelo la presencia del gen NDM, por ello es importante realizar una detección, confirmación y comunicación oportuna del aislamiento de enterobacterias sospechosas.

2. Antecedentes

En el año 2009 en Suecia; (Yong D. et al) reportan el primer caso clínico en el cual se detectó la producción de blaNDM a nivel mundial, fue un paciente masculino de 59 años que era originario de la India pero que había vivido en Suecia durante muchos años y que a menudo regresaba a la India, en el 2008 es remitido a un hospital de Örebro en Suecia Durante su estadía se le aísla *Klebsiella pneumoniae*, los estudios moleculares no fueron concluyentes ya que no se pudo detectar ninguno de los genes de las MBL, posteriores pruebas realizadas por Yong D. et al demostraron que la cepa poseía nuevo tipo de Carbapenemasa B, al cual nombraron Nueva Delhi Metallo-beta-lactamasa.

Por otra parte, en el año 2012 en Guatemala; (Pasteran F. et al) informan de los dos primeros casos de *K. pneumoniae* productores de NDM identificados. El primer caso correspondió a un paciente de 1 año con neumonía nosocomial el segundo caso correspondió a un paciente adulto. Las cepas se enviaron a la laboratorio referencia regional de Argentina para su analisis, los estudios moleculares confirmaron la presencia de blaNDM en las cepas.

En el año 2014 en Guatemala; (Chinchilla, Tomas, & Morales) realizaron otro estudio donde identificaron la presencia de carbapenemasas tipo Nueva Delhi Metallo- β -lactamasas (NDM) en enterobacterias con β -lactamasas de Espectro Extendido (BLEE), De 118 cepas el 58% fueron *E. coli* y el 42% *K. pneumoniae*, el 19% presentaron el gen NDM.

En el año 2014 en Argentina; los científicos del Laboratorio Nacional de referencia de argentina (INEI-ANLIS) confirman su primer hallazgo de colonización por enterobacteria productora de una metalo-beta-lactamasa del tipo NDM en la Ciudad de Buenos Aires y fue confirmado como *Providencia rettgeri*, La cepa fue aislada de un paciente de mediana edad, con hospitalización y sin antecedentes de viaje.

En el año 2014 en Costa Rica; El Centro Nacional De Referencia de Bacteriología de Costa Rica en conjunto con el Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza en nutrición y salud realiza su primer aislamiento de Metallo- β -lactamasa New Delhi correspondiente a una cepa de *Escherichia coli* aislada del urocultivo de una paciente pediátrica procedente de Nicaragua.

En el año 2016 en Nicaragua; (Arbizu O. et al) y realizaron una investigación en el Hospital Alemán Nicaragüense donde se estudiaron 249 cepas, de la cuales, 45 eran resistentes a los carbapenémicos; 20 de estas cepas dieron positivas para genes metalo enzimas (IMP, VIM, SPM, SIM, GIM), sin embargo, en 21 cepas fue identificado el gen New Delhi, El 66% de New Delhi pertenecía a *Klebsiella pneumoniae* seguida de *E. vulneris* con el 14% en *Escherichia coli*, *P. rettgeri*, *P. agglomerans* y *Kluyvera cryocrescens* en un 5% respectivamente.

3. Justificación

La aparición de enterobacterias resistentes a carbapenémicos es un serio problema de salud mundial que se encuentra en aumento, el uso inapropiado de antibióticos y la aplicación insuficiente de las medidas de prevención y control, son unos de los factores más importantes relacionados con la diseminación de bacterias multirresistentes. Adicionalmente, las bacterias tienen la capacidad de mutar o generar mecanismos para transferir genes de resistencia. En consecuencia, las infecciones ocasionadas por bacterias resistentes, son una causa importante del aumento de la morbilidad y mortalidad en pacientes hospitalizados y constituyen una carga social y económica significativa tanto para el paciente como para el sistema de salud en general, debido principalmente a estancias hospitalarias más prolongadas y mayores riesgos de mortalidad.

Actuales estudios epidemiológicos destacan la adquisición bacteriana del potente arsenal en resistencia como lo es la carbapenemasa NDM, el cual representa una amenaza global por su alta eficacia en la hidrólisis de todos los antibióticos β -lactámicos (excepto aztreonam), incluyendo los carbapenémicos, que son utilizados como la última herramienta terapéutica cuando los otros antibióticos han fracasado. Es por tal razón que surge la necesidad de este estudio monográfico, con el fin de aportar información epidemiológica sobre la prevalencia del gen blaNDM basada en métodos moleculares y de esta manera contribuir con datos de gran relevancia, para que los médicos puedan tomar las medidas apropiadas para el manejo de los pacientes y a su vez las autoridades pertinentes puedan instaurar las medidas de vigilancia y contención para evitar la diseminación de este gen.

Con este estudio se aportará información que será de mucha utilidad, al personal médico del Hospital Antonio Lenin Fonseca, al Comité de Infecciones Intrahospitalarias y a las Autoridades del Ministerio de Salud y a la UNAN-Managua como fortalecimiento del conocimiento.

4. Planteamiento del problema

¿Cuál es la prevalencia del gen blaNDM en *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*, Aislados de procesos infecciosos en paciente del Hospital Antonio Lenin Fonseca de la ciudad de Managua en el periodo de Junio a Octubre – 2017?

5. Objetivo general

Conocer la prevalencia del gen blaNDM en *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*, Aislados de procesos infecciosos en paciente del Hospital Antonio Lenin Fonseca de la ciudad de Managua en el periodo de Junio a Octubre – 2017

Objetivos específicos

1. Detectar fenotípicamente la resistencia a carbapemicos mediante test de sinergia con ácido etilendiaminotetraacético en cepas de *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*.
2. Identificar la prevalencia del gen blaNDM mediante técnica Molecular de (PCR) en cepas de *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*.
3. Describir el perfil de resistencia antimicrobiano de las cepas en estudio.

6. Marco teórico

6.1 Familia Enterobacteriaceae

La familia Enterobacteriaceae es un grupo de bacterias que contiene más de 30 géneros y más de 100 especies. Los miembros de esta familia forman parte de la microbiota del intestino, de otros órganos del ser humano y de otras especies animales. (Ortega M. G., 2014) Son microorganismos con forma de bastón, por lo general de 1-3 μm de largo y 0,5 μm de diámetro, su envoltura celular se caracteriza por una estructura multilaminar. La membrana interna consiste en una doble capa de fosfolípidos que regula el paso de nutrientes, metabolitos y macromoléculas. La capa externa, consiste en un peptidoglucano delgado junto con un espacio periplásmico que contiene una elevada concentración de proteínas. La membrana externa compleja consiste en otra doble capa de fosfolípidos que incluyen lipopolisacáridos (LPS), lipoproteínas, proteínas porinas multiméricas y otras proteínas de la membrana externa. Entre estas proteínas hay algunas organelas complejas que irradian hacia el exterior: los flagelos, estructuras que se utilizan para la locomoción y que provienen de una estructura basal localizada en la membrana interna, las fimbrias (o pili comunes), con importante función como adhesinas y los pili sexuales, estructuras presentes en las bacterias que contienen plásmidos conjugativos y que las bacterias utilizan para mediar la transferencia conjugativa de ADN del plásmido. (García & Rodríguez, 2010)

6.1.1 Genero *Klebsiella*

Klebsiella pneumoniae es la especie de mayor relevancia clínica dentro del género bacteriano *Klebsiella*, compuesto por bacterias gramnegativas de la familia Enterobacteriaceae, que desempeñan un importante papel como causa de las enfermedades infecciosas oportunistas. Fermentan la lactosa, la mayoría produce colonias sumamente mucoides en placas debido a la producción de una cápsula de polisacárido abundante y todas son inmóviles. Son indol-negativas y pueden crecer en KCN y utilizar citrato como única fuente de carbono. *K. pneumoniae* forma parte de la flora habitual intestinal y de la cavidad oral. Es capaz de causar ITU y neumonía en personas por lo demás sanas, aunque casi todas las infecciones por este microorganismo se adquieren en el hospital u ocurren en pacientes debilitados por enfermedades subyacentes. (García & Rodríguez, 2010)

6.1.2 Genero Escherichia

Comprende solo una especie de importancia médica (*Escherichia coli*) y son capaces de producir infecciones del tracto urinario y entéricas tales como: diarrea, disentería, colitis hemorrágica, síndrome urémico hemolítico o extraintestinales (infecciones urinarias, septicemias, meningitis, peritonitis, abscesos, etc.). Como todas las bacterias Gram negativas, la cubierta de *E. coli* consta de tres elementos: la membrana citoplasmática, la membrana externa y, entre ambas, un espacio periplásmico constituido por péptido-glucano. Esta última estructura confiere a la bacteria su forma y rigidez, y le permite resistir presiones osmóticas ambientales relativamente elevadas su óptimo de desarrollo se encuentra en el entorno de la temperatura corporal de los animales de sangre caliente. (Ortiz, Rodríguez, & Urbina, 2014)

6.2 Agentes antimicrobianos

Los antibióticos constituyen un grupo heterogéneo de sustancias con diferente comportamiento farmacocinético y farmacodinámico, ejercen una acción específica sobre alguna estructura o función del microorganismo, tienen elevada potencia biológica actuando a bajas concentraciones y la toxicidad es selectiva, con una mínima toxicidad para las células de nuestro organismo. El objetivo de la antibioticoterapia es controlar y disminuir el número de microorganismos viables, de modo que el sistema inmunológico sea capaz de eliminar la totalidad de los mismos. (Seija & Vignoli, 2006)

Betalactámicos

Los betalactámicos son un grupo de antibióticos de origen natural o semisintético que se caracterizan por poseer en su estructura un anillo betalactámico. Actúan inhibiendo la última etapa de la síntesis de la pared celular bacteriana. Constituyen la familia más numerosa de antimicrobianos y la más utilizada en la práctica clínica. (Seija & Vignoli, 2006)

Familia de los Carbapenemes

Los carbapenemes pertenecen al grupo de los antibióticos beta-lactámicos. Al igual que las penicilinas, el anillo beta-lactámico está unido a un anillo de cinco componentes, pero en el caso de los carbapenemes es insaturado y con un átomo de carbono sustituyendo al azufre

característico típico de las penicilinas. Estas características bioquímicas son responsables de que los carbapenemes compartan algunas características con otros agentes beta-lactámicos, como las penicilinas y las cefalosporinas, pero que también tengan algunas propiedades muy distintas de ellos. (Quesada, 2009)

Mecanismo de acción

Las enzimas transpeptidasas catalizan la reacción que forma un enlace cruzado entre los peptidoglicanos de la pared celular bacteriana; esta condición es necesaria para mantener la forma celular y prevenir la lisis por la presión osmótica elevada. Las isoenzimas transpeptidasas se encuentran en las proteínas fijadoras de penicilinas. La estructura química de los agentes beta-lactámicos es muy similar a la del sustrato de las transpeptidasas, por lo que pueden unirse al sitio activo de esas isoenzimas, inactivándolas de forma irreversible. Como resultado, al inhibir la síntesis del peptidoglicano se interfiere con la estructura de la pared celular bacteriana, lo que conduce a la muerte bacteriana en aquellas que se encuentren en crecimiento activo y sintetizando la pared celular. La muerte celular está relacionada con hidrolasas, llamadas autolisinas, localizadas en la pared celular. (Quesada, 2009)

Imipenem

Imipenem, también conocido como N-formimidoil-tienamicina, es un derivado semi-sintético de tienamicina, el compuesto original producido por la bacteria filamentosa *Streptomyces cattleya*. Su actividad bactericida se produce inhibiendo la síntesis de la pared celular bacteriana en bacterias Grampositivas y Gram-negativas, mediante la unión a proteínas transportadoras de penicilina (PBPs). (AEP, 2015)

Meropenem

El Meropenem es un carbapenem semi-sintético químicamente similar a Imipenem, con un grupo metilo en C1 y un grupo dimetil-carbomoilpirrolidinetio en C2 que sustituye a la cadena lateral tio-alquílica del Imipenem, aumentando la actividad sobre bacterias gramnegativas. (Gobernado M. , 2010)

6.3 Mecanismos de resistencia

La resistencia bacteriana tanto natural como adquirida se puede abordar desde el punto de vista molecular y bioquímico de tal forma que se pueden clasificar en tres mecanismos básicos, por medio de los cuales las cepas bacterianas pueden adquirir resistencia a los antibióticos de acuerdo al mecanismo expresado y el mecanismo de acción del antibiótico. Los mecanismos de resistencia son: inactivación del antibiótico, alteración del sitio blanco del antibiótico y alteración de barreras de permeabilidad. Cabe resaltar que los tres mecanismos pueden ocurrir simultáneamente (Cano & Contreras., 2013)

6.3.1 Resistencia natural

Las bacterias poseen patrones propios de resistencia a los antimicrobianos, esta depende defunciones o estructuras codificadas generalmente en el cromosoma bacteriano. Se caracteriza por ser inherente a una especie en particular, ya que dichos microorganismos pueden perder los sitios blancos o poseer barreras naturales, evitando que el agente antibacteriano actúe al no poder alcanzar su objetivo. Es una propiedad innata de la bacteria y pueden estar involucrados uno o varios mecanismos de resistencia. (Ortiz, Rodríguez, & Urbina, 2014)

6.3.2 Resistencia adquirida

La resistencia adquirida es una característica propia de una especie bacteriana, que por naturaleza es sensible a un antibiótico pero que ha sido modificada genéticamente ya sea por mutación o por adquisición de genes de resistencia (plásmidos, transposones e integrones). Son evolutivas y su frecuencia depende de la utilización de los antibióticos. (Cano & Contreras., 2013)

6.3.3 Transferencia genética horizontal

La transferencia genética horizontal (TGH) es el evento por el cual un organismo adquiere material genético de otra célula que no es su progenitor mecanismos muy común entre las bacterias. Por el contrario, la transferencia vertical ocurre cuando un organismo recibe material genético de sus ancestros, como en el caso de las bacterias en las cuales la

Transferencia Vertical ocurre por fisión binaria cuando las bacterias se duplican. (UBA, 2015)

Plásmidos

Son moléculas circulares de ADN de doble cadena que constituyen una unidad de replicación independiente del cromosoma. Por esto puede encontrarse más de una copia del mismo plásmido dentro de la célula bacteriana. En general los plásmidos de mayor tamaño se encuentran en una o unas pocas copias, mientras que los más pequeños pueden estar en hasta cien copias por célula. Aunque el ADN plasmídico no porta información genética esencial para la vida de la bacteria, sí porta genes que le confieren nuevas propiedades fenotípicas y que le pueden ser útiles para su adaptación al crecimiento en determinados ambientes, y en algunos casos estos plásmidos contienen genes que codifican enzimas capaces de degradar algunos antibióticos, permitiendo que la bacteria sobreviva a la acción de los mismos. (Betancor, Gadea, & Flores, 2006)

Transposones

Los Transposones son segmentos de ADN que además de portar la información necesaria para la transposición, contienen genes que pueden codificar diferentes propiedades fenotípicas. Dentro de éstas se destaca la resistencia a ciertos antibióticos. Algunos plásmidos poseen uno o más Transposones que portan determinantes de resistencia a antibióticos; la capacidad de estos elementos para transponerse de un plásmido a otro, proporciona a la bacteria gran flexibilidad para desarrollar resistencia, dado que dichos plásmidos son generalmente conjugativos, por lo que pueden transferirse entre distintas bacterias. (Betancor, Gadea, & Flores, 2006)

Integriones

Son elementos de ADN móviles que pueden capturar genes de resistencia o virulencia, los cuales están en " cassettes " y como acarrean una integrasa, pueden introducirse en el cromosoma, los transposones y los plásmidos de bacterias; de esta manera, pueden replicarse y expresar la información que llevan. (López, 2011)

6.3.4 Mecanismos de Resistencia a los Antibióticos β -lactámicos

6.3.4.1 Alteración en las barreras de permeabilidad

Las porinas son canales proteicos de la membrana externa de las bacterias Gram negativas que participan en el transporte de moléculas hidrofílicas desde el medio externo al espacio periplasmático. Los carbapenem llegan al espacio periplasmático pasando a través de porinas. Los genes que codifican las porinas pueden sufrir mutaciones y producir proteínas alteradas no funcionales o pueden disminuir su expresión. Ambos procesos dan origen a bacterias mutantes deficientes en porinas, las cuales presentan una baja permeabilidad al paso de moléculas hidrofílicas como los carbapenem. (Suárez, Kattán, Guzmán, & Villegas, 2006)

6.3.4.2 Bombas de Eflujo

En la membrana celular se encuentran las llamadas bombas de eflujo que llevan a cabo la internalización y expulsión de los antimicrobianos. Una amplia variedad de bombas de eflujo provee resistencia antimicrobiana tanto en bacterias Gram positivas como en Gram negativas. En el caso de las bacterias Gram negativas involucra también componentes en la membrana externa y citoplasma. Estas proteínas forman canales que exportan activamente a un agente antimicrobiano fuera de la célula tan rápido como entra. Este mecanismo confiere resistencia a tetraciclinas, quinolonas, cloranfenicol, beta lactámicos, así como a los antisépticos y desinfectantes de tipo amonio cuaternario utilizado para la limpieza de superficies. (Cano & Contreras., 2013)

6.3.4.3 Modificación del sitio blanco

Las bacterias pueden alterar el sitio donde el antibiótico se une. Este mecanismo es principalmente utilizado en bacterias Gram positivas, sin embargo, el número de reportes de Gram negativos resistentes a carbapenémicos mediado por este mecanismo ha ido en aumento. En el caso de los carbapenémicos, la modificación en las PBP disminuye su afinidad por los β -lactámicos sin afectar su función dentro de la célula bacteriana. Este mecanismo además podría ser el responsable que algunas especies de forma natural sean poco sensibles o resistentes (Tafur, Torres, & Villegas, 2008)

6.3.4.4 Modificación enzimática del antibiótico

Las bacterias producen enzimas capaces de crear cambios en la estructura del antibiótico, haciendo que este pierda su funcionalidad. Las β -lactamasas son proteínas que hidrolizan el anillo β -lactámico de los antibióticos. De igual forma las enzimas modificadoras de los aminoglucósidos son capaces de modificar estos antibióticos, mediante reacciones de acetilación, adenilación y fosforilación. (Ortiz, Rodríguez, & Urbina, 2014)

6.3.5 Mecanismo de Resistencia de *Klebsiella pneumoniae*

Las cepas de este género presentan, como única resistencia natural, la producción de una β -lactamasa de espectro ampliado (BLEA). Prácticamente todas las *Klebsiella pneumoniae* producen cromosómica y constitutivamente bajos niveles de esta enzima, se trata de SHV-1 (clase A de Ambler, grupo 2b de Bush). El espectro de actividad de esta β -lactamasa incluye amino y carboxipenicilinas, es por ello que, a pesar de los bajos niveles de enzima producidos, *Klebsiella pneumoniae*, es naturalmente resistentes a ampicilina (AMP), amoxicilina (AMX), carbenicilina (CAR) y ticarcilina (TIC) (Ortiz, Rodríguez, & Urbina, 2014)

6.3.6 Mecanismo de Resistencia *Escherichia coli*

Escherichia coli no presentan resistencia natural a los antibióticos beta-lactámicos, excepto a Penicilina, Meticilina y Oxacilina, E. coli aunque producen la enzima tipo AmpC en forma constitutiva, no inducible, habitualmente con un mínimo modo de expresión, no presentan resistencia a las aminopenicilinas (ampicilina y amoxicilina), carboxipenicilinas (carbenicilina y ticarcilina) y acil ureidopenicilinas (mezlocilina y piperacilina), salvo en cepas que hiperproducen AmpC.

6.4 Clasificación de las carbapenemasas

Las carbapenemasas representan la familia más versátil de las β -lactamasas. Tienen la capacidad de hidrolizar tanto a los carbapenémicos como a otros β -lactámicos. Además, presentan la característica de ser resistentes contra la acción de los inhibidores de β -lactamasas disponibles. Pueden estar codificadas en el cromosoma bacteriano o estar

presentes en elementos genéticos móviles. Se ha propuesto una clasificación en cuatro grupos: (Moreno, 2013)

Clase A: penicilinasas (encontradas en *Staphylococcus aureus*), TEM-1, SHV-1, β -lactamasas cromosomales de *Proteus*, *Klebsiella* y carbapenemasas.

Clase B: Metallo β -lactamasas que requieren un ion bivalente para su actividad (Zinc²⁺).

Clase C: β -lactamasas usualmente tipo cromosomal, AmpC propia de la mayoría de Enterobacterias.

Clase D: β -lactamasas plasmidial tipo OXA.

6.4.1 Metallo- β -lactamasa

Este es quizá el grupo más relevante de carbapenemasas debido tanto a su diversificación estructural como a su diseminación prácticamente mundial y en diferentes especies bacterianas. Son enzimas que típicamente hidrolizan todos los β -lactámicos excepto monobactámicos y son inhibidas por quelantes de iones metálicos tales como EDTA o ácido dipicolínico. Los genes MBLs pueden ser transportados en cassettes dentro de integrones, transposones, plásmidos, elementos denominados regiones comunes (CRs) que pueden o no ser transferibles, o estar insertos en el cromosoma. La adquisición de estos genes potencialmente pueden conferir resistencia a un amplio espectro de antibióticos β -lactámicos. Dentro de las MBLs se distinguen ocho grupos: IMP, VIM, SPM, SIM, GIM, AIM, DIM y NDM. (Moreno, 2013)

6.5 New Delhi metallo-beta-lactamasa.

La NDM-1, es una carbapenemasa transferible perteneciente a la clase molecular B de la clasificación de Ambler, caracterizándose por presentar zinc en su sitio activo y pudiendo hidrolizar a todos los beta-lactámicos, a excepción de los monobactámicos. Así mismo, las bacterias NDM-1, suelen cursar con otros mecanismos de resistencia frente a antibióticos de diversas familias. (Delgado, Montenegro, Chiappe, & al, 2017)

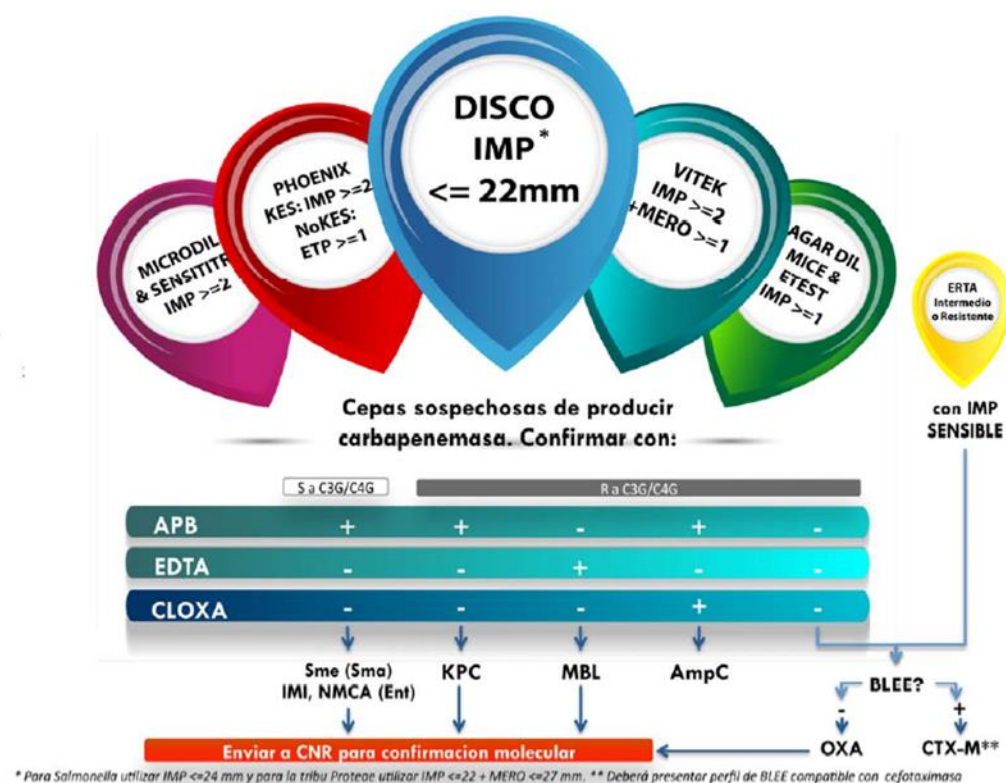
6.6 Detección de Carbapenemasas

La detección de enterobacterias productoras de carbapenemasas en el laboratorio requiere un análisis detallado del antibiograma y de la sensibilidad a todos los beta-lactámicos, la implementación con métodos fenotípicos y la confirmación mediante detección de la

hidrólisis del carbapenem, inhibición de la actividad de la enzima con inhibidores específicos y mediante métodos moleculares.

6.6.1 Métodos fenotípicos

La identificación fenotípica bacteriana se basa fundamentalmente en la comparación de las características fenotípicas de bacterias desconocidas con aquellas de cultivos tipo. La fiabilidad de la identificación está en proporción directa al número de características similares. En Microbiología Clínica, la experiencia y asociación entre el microorganismo y el sitio y tipo de infección es de gran ayuda en la identificación preliminar.



6.6.1.1 Kirby-Bauer

La prueba de sensibilidad por difusión con discos o método de Kirby-Bauer consiste en colocar discos de papel impregnados de antibióticos en la superficie de un agar previamente inoculado con una suspensión bacteriana de concentración conocida. La concentración del antibiótico disminuye a medida que se incrementa la distancia desde el disco. Se produce simultáneamente la difusión de antibiótico y el crecimiento bacteriano en la superficie del agar. Cuando se alcanza la masa celular crítica de bacterias, después de 4 ó 10 horas, aparece

el crecimiento bacteriano. En el área donde la concentración de antibiótico es suficiente para evitar el crecimiento bacteriano se observa un halo de inhibición con borde definido claramente y con el disco ubicado en el centro del círculo. En el borde de este halo la concentración del antibiótico, conocida también como concentración crítica, se aproxima a la CIM (Concentración Inhibitoria Mínima o MIC por sus siglas en inglés) obtenida en las pruebas de dilución. (WHONET, PROTOCOLO DE TRABAJO RED WHONET ARGENTINA, 2017)

Imipenem y Meropenem para detección de carbapenemasas:

La resistencia a carbapenemes en enterobacterias es cada vez más frecuente. Si se utiliza el método de difusión con discos se debe tener en cuenta el punto de <22 mm para IMI como screening de presencia de carbapenemasas, excepto en *Salmonella spp* que se utiliza IMI<24 mm y en tribu *Proteae* donde las cepas salvajes pueden dar valores de halo de inhibición menores a 22 mm y por lo tanto no es aplicable (WHONET, PROTOCOLO DE TRABAJO RED WHONET ARGENTINA, 2017)

6.6.1.2 Test de sinergia con EDTA

El disco de EDTA, es empleado en la detección fenotípica de Metallo- β -lactamasa (MBLs), por el método de triple disco, el cual consiste en colocar, sobre una placa de agar Mueller-Hinton inoculado con la cepa problema, un disco que contiene un agente quelante (EDTA, SMA, ácido dipicolínico o ácido 2-mercaptopropiónico) rodeado por un disco de Imipenem (10 μ g) y otro de Meropenem (10 μ g). Esta prueba es positiva si se observa un aumento del halo de inhibición o la presencia de una zona de inhibición entre el Imipenem y/o el Meropenem y el agente quelante. Ver figura 1. (Guevara, Gamboa, Machado, & Vera, 2010)



Figura 1. Test de sinergismo con triple disco. En esta fotografía se muestra el efecto sinérgico entre el disco de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) con los carbapenems al colocar los discos a una distancia de 20 Mm (centro a centro). (Ortega R. , 2017)

6.6.2 Método Genotípico

Las ventajas de las técnicas moleculares radican en su sensibilidad, su especificidad y su seguridad. Desde el punto de vista de la seguridad, estas técnicas no requieren el aislamiento del agente infeccioso y se pueden llevar a cabo en muestras o extractos fijados químicamente (inactivados). Debido a su sensibilidad, permiten detectar muestras muy diluidas de ADN microbiano en un tejido, aunque el agente no se esté replicando ni produciendo otros indicios de infección. Estas técnicas permiten distinguir cepas basándose en las diferencias de sus genotipos (es decir, mutantes), lo cual resulta especialmente útil para distinguir cepas resistentes a los agentes antivíricos, las cuales pueden diferir en un único nucleótido (Murray, Rosenthal, & Pfaller, 2013)

6.6.2.1 Reacción en cadena de la polimerasa

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR (siglas de su nombre en inglés Polymerase Chain Reaction) permite generar una gran cantidad de copias de un fragmento de DNA (ácido desoxirribonucleico). El requisito fundamental para poder llevar a cabo la reacción es disponer de fragmentos cortos de DNA de cadena sencilla complementarios a los extremos del fragmento a amplificar. Estos fragmentos servirán como cebadores para que una enzima polimerasa sea capaz de incorporar nucleótidos complementarios a la cadena molde. Una vez completada la reacción la cantidad fragmento amplificado se puede visualizar mediante técnicas sencillas de separación de fragmentos de DNA. (Pérez, 2017)

Etapas de la PCR

La PCR es un proceso que consta de tres pasos:

- **Desnaturalización:** En esta el ADN blanco de doble cadena se somete a una temperatura de 90° a 95 °C durante 30 segundos permitiendo la separación de las dos cadenas.
- **Alineamiento:** En esta la temperatura de la mezcla se disminuye hasta alcanzar la temperatura adecuada para favorecer el apareamiento de los primers con la secuencia blanco, lo cual generalmente ocurre entre 45 a 55 °C (dependiendo de la temperatura de Fusión o Tm de los primers) durante 20 a 30 segundos

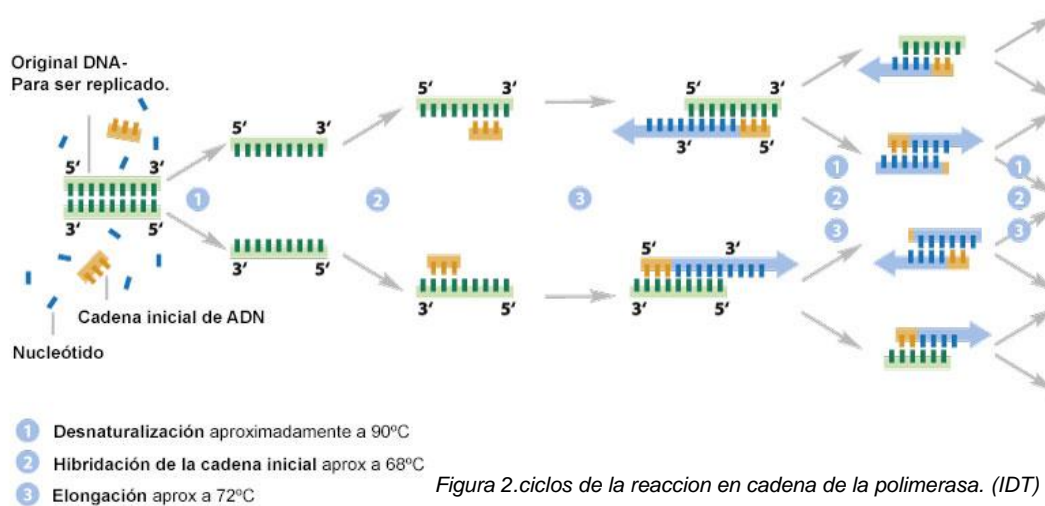


Figura 2. ciclos de la reaccion en cadena de la polimerasa. (IDT)

- **Elongación o extensión:** En este la temperatura de la mezcla se eleva hasta 72 °C para que la Taq polimerasa (DNA polimerasa) comience el proceso de extensión en dirección 5' a 3' agregando los nucleótidos correspondientes, obteniéndose la hebra complementaria de DNA o AMPLICÓN.

Fundamento

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) amplifica copias simples de ADN varios millones de veces y constituye una de las técnicas más modernas de análisis genético. Se incubaba la muestra con dos oligómeros cortos de ADN, denominados primers, los cuales contienen unas secuencias complementarias a las de los extremos de una secuencia genética conocida del ADN completo, una polimerasa de ADN dotada de estabilidad térmica (Taq u otra polimerasa obtenida a partir de bacterias termofílicas), nucleótidos y tampones. Los oligómeros se hibridan con la secuencia apropiada de ADN y actúan como primers para la polimerasa, la cual copia ese segmento de ADN. Posteriormente se calienta la muestra con el propósito de desnaturalizar el ADN (separar las cadenas de la doble hélice) y se enfría para permitir la hibridación de los primers con el nuevo ADN formado en el ciclo anterior. Cada copia de ADN se convierte en una nueva plantilla para la síntesis de nuevas moléculas. El proceso se repite un gran número de veces (de 20 a 40) con el fin de amplificar la secuencia del ADN original de manera exponencial. Una secuencia diana se puede amplificar 1.000.000

de veces en unas pocas horas con este método. Esto con el propósito de identificar el agente causante de la enfermedad (Rodríguez & Barrios, 2007)

Componentes de la reacción

Deoxinucleótidos trifosfato (dNTPs)

Los dNTP que se usan en la replicación del ADN contienen tres fosfatos unidos al grupo hidroxilo 5' de la desoxirribosa y dependiendo de la base nitrogenada serán dATP, dTTP, dCTP o dGTP.

Primers

Son secuencias cortas de nucleótidos 20-24 nucleótidos de longitud, complementarias a una región del DNA que se quiere amplificar.

Tampón de la reacción

Por lo general está formado por: 10 mM tris-HCl (pH=8.4 a T^a ambiente), 50 mM ClK, 0.1% w/v gelatina y 1.5 mM MgCl

Taq DNA Polimerasa

La polimerasa Taq trabajará en el paso de replicación: la polimerasa construye cada cadena simple de ADN marcada por un iniciador en una cadena doble de ADN.

Electroforesis en gel de agarosa

La electroforesis en gel de agarosa es una de las técnicas más utilizadas para analizar y caracterizar ácidos nucleicos de distintas procedencias. Los geles se comportan como un tamiz molecular y permiten separar moléculas cargadas en función de su tamaño y forma. Así, moléculas de DNA de diferente tamaño van a emigrar de forma distinta en una electroforesis en gel de agarosa. Además, si en dicha electroforesis se aplican marcadores de peso molecular (fragmentos de DNA de tamaño conocido) se puede calcular el tamaño aproximado del DNA en estudio. (Padilla, Dapena, Galisteo, & et al)

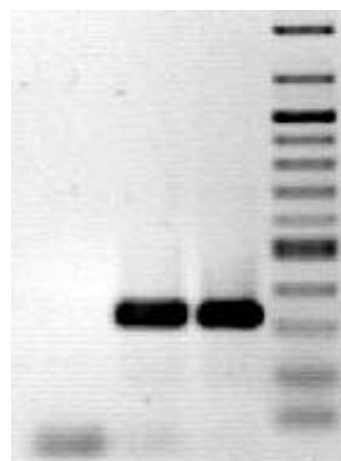


Figura 3. Corrida electroforética en gel de agarosa, para revelar una reacción de PCR. En el carril de la derecha se observa un marcador de peso molecular y en los dos carriles anteriores el producto de la

7. Diseño metodológico

Área de estudio

El estudio se realizó en el Hospital Antonio Lenin Fonseca de la ciudad de Managua. Siendo este un hospital de referencia nacional, donde se da atención general a una gran cantidad de pacientes este cuenta con diversas especialidades y tiene la capacidad de albergar hasta 230 paciente en cama.

Tipo de estudio

Se realizó un estudio de tipo prospectivo descriptivo de corte transversal, en el cual se llevó a cabo la identificación fenotípica de Enterobacterias Gram negativas productoras de Carbapenemasas y genes que portan blaNDM en cepas aisladas de procesos infecciosos en los pacientes del hospital Antonio Lenin Fonseca.

Universo

El universo estuvo conformado por 152 cepas; 54 *Klebsiella pneumoniae* y 98 de *Escherichia coli*, aisladas de pacientes atendidos por procesos infecciosos en el hospital Antonio Lenin Fonseca en los meses de Junio - Octubre 2017, las cuales representa el 100% del universo.

Muestras

La muestra de estudio estuvo conformada por 13 cepas; 10 de *Klebsiella pneumoniae* y 3 de *Escherichia coli* fenotípicamente resistentes a los carbapenemicos que equivalen al 18.89% del universo de las muestras remitida al área de bacteriología del Hospital Antonio Lenin Fonseca, durante el periodo en estudio.

Tipo de muestreo

Se realizo un estudio no probabilístico por conveniencia.

Criterios de inclusión

- Que las cepas obtenidas fuesen identificadas como *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*.
- Que las cepas presentaran fenotípicamente el mecanismo de sinergia con EDTA.

- Que las cepas presenten valores de halos de inhibición menores a 22mm para IMP y MEM.
- Que las cepas fuesen obtenidas de pacientes hospitalizados en el Hospital Antonio Lenin Fonseca.

Recolección de datos

Se solicitó autorización para el acceso a los registros de laboratorio, que el hospital lleva de los pacientes que son sospechosos de carbapenemasa, de donde fueron extraídos los datos de cada paciente.

Ética de la investigación

Los aspectos éticos se basaron en garantizar la confidencialidad de la información que se encontró en los antibiogramas y registros de identificación. De esta manera los investigadores se comprometen a no publicar ni proporcionar información a terceros de ningún dato que identifique la persona a quien se le realizó el cultivo. La información de las cepas de Enterobacterias resistente a Carbapenem fueron recolectadas, mediante una autorización por escrito dirigida al director del laboratorio del Hospital Antonio Lenin Fonseca

Obtención de la muestra

Las muestras de cepas de Enterobacterias resistente a Carbapenem fueron recolectadas, mediante un cultivo de muestras biológicas procedentes de pacientes internos en la sala UCI del Hospital Antonio Lenin Fonseca.

Limitaciones del estudio.

La mayor dificultad que se presentó durante el estudio fue la obtención de recursos económicos para adquisición de los materiales para la realización de las pruebas genotípicas.

Procesamiento y análisis de la muestra

Recuperación de las cepas en estudio.

Identificadas y llenadas fichas de datos, las cepas se inocularon en Agar MacConkey para su recuperación y activación, se incubaron por 18 horas a 37°C, esta recuperación de colonias se realizó en el laboratorio de bacteriología del hospital Antonio Lenin Fonseca, se trasladaron las cepas en placas selladas y rotuladas, hasta los laboratorios de Biología molecular para la realización de la extracción del ADN y posterior realización de la PCR convencional.

a) Inoculación en Agar MacConkey

Se ambientaron placas de agar MacConkey y rotular respectivamente:

1. Se tomó una UFC con un asa redonda, de un plato anteriormente inoculado.
2. Se realizó la siembra haciendo rayado por agotamiento para obtener colonias características y bien aisladas.
3. Se llevaron las placas y colocaron en posición invertida en ambiente de incubación con temperaturas de 36°C por 18 horas.
4. Luego del periodo de incubación se observaron colonias características y crecimientos sin contaminaciones por otros microorganismos, se sellaron las placas con papel parafilm, después se colocaron en bolsas de seguridad y se guardaron en termos para su transporte hacia el laboratorio de biología molecular.

b) Test de sinergia con EDTA

La fenotipificación de las cepas se realizó en el laboratorio de bacteriología del hospital Antonio Lenin Fonseca

1. Se tomó una UFC con un asa recta y se realizó una suspensión del microorganismo en solución salina al 0.85%, se ajustó la turbidez del inóculo a la escala 0.5 McFarland.
2. Se inóculo sobre la superficie del agar Mueller-Hinton en tres direcciones, se dejó secar la placa por 5 minutos, colocamos un disco de EDTA de (10ug) a 15 mm entre

un disco de IMI y un disco de MEM, se incubo a 35°C en aerobiosis durante 16-18 horas.

3. El resultado positivo se evidenció por la sinergia o deformación de los halos (efecto huevo), en cualquiera de los dos antibióticos hacia el EDTA, indicando la presencia de Metallo- β -lactamasas (fig. 1) y un resultado negativo no presenta sinergia o deformación de los halos.

c) Extracción de ADN de las cepas en estudio.

La extracción del ADN de las cepas se realizó en el laboratorio de biología molecular del POLISAL.

1. En un tubo Eppendorf rotulado se midieron 100 μ l de aguas libres de nucleasas.
2. De un cultivo fresco(24h) se realizó un pool de células/ufc (4-5 colonias) y se inoculo en el tubo Eppendorf con agua libre de nucleasas.
3. Se dio vortex para homogenizar la muestra.
4. Se coloco el tubo en baño maría en ebullición por 10 minutos.
5. Se retiro la muestra y se enfrió en hielo por 5 minutos.
6. Luego se centrifugo a 12,000 rpm por 5 minutos.
7. Se extrajo 80 μ l del sobrenadante en un nuevo tubo Eppendorf asegurando la tapa y rotulándose según la cepa extraída.
8. Finalmente, de se procedió a guardar las extracciones en refrigeración a -70°C.

d) Reacción en cadena de la polimerasa

Se realizó la mezcla del Mastermix para la técnica PCR convencional, donde se colocaron los diversos componentes de acuerdo al protocolo de trabajo y de acuerdo al volumen de muestra a correr en la PCR.

Protocolo de trabajo para la mezcla y amplificación corrida de New Delhi Metalo carbapemasa		
Nombre primer	Gen	Secuencia 5´--3´
NDM-F	NDM	5'- AGC ACA CTT CCT ATC TCG AC -3'
NDM -R		5- GGC GTA GTG CTC AGT GTC -3'
Tamaño amplicón	Ciclado	
512pb	Desnaturalización inicial = 94°C por 5min. Ciclado =30-35 ciclos de:94°C 20seg -- 50°C 30seg -- 72°C 60seg; Extensión final = 72°C por 10min	
Reactivo	Volumen	
Reaction Buffer(10x)	2,5	µl
Enhancer solution P. 5x	0.7	µl
DNTPs	0.5	µl
Bla-NDM Forward	0.5	µl
Bla-NDM Reverse	0.5	µl
Taq-polimerasa	0.5	µl
ADN (producto)	2.5	µl
Agua (Sigma)	17.5	µl
Volumen final	25	µl

e) Preparación del gel agarosa para la corrida (1.5 %)

1. Se pesaron 1.5 gr de agarosa liofilizada y se colocaron en un beaker.
2. Se le agregaron 100 ml de TBE con concentración de 1X
3. Se colocó el beaker en el microondas por 2-3 minutos hasta que se disolvió completamente presentando aspecto transparente.
4. Luego se colocaron 3 µl de Bromuro de etidio y se mezcló.
5. Se vertió el gel en la cámara con peine para su gelificación.
6. Una vez gelificado se retiró el peine y se le colocó TBE 1X en los lados de la cámara.

f) Electroforesis en gel de agarosa

Se le agregó buffer TBE 1X hasta cubrir el gel, posteriormente se procedió a montar el marcador, los controles y las muestras. Se conectaron los electrodos de la cámara a la fuente de poder, se graduó el voltaje a 120 v, para la corrida de las muestras por un periodo de 1 hora y 30 minutos. El Gen investigado fue: NDM con un peso molecular 512pb los genes se expusieron a luz ultravioleta, fueron analizados según su peso molecular y fotografiados.

Procesamiento de la información

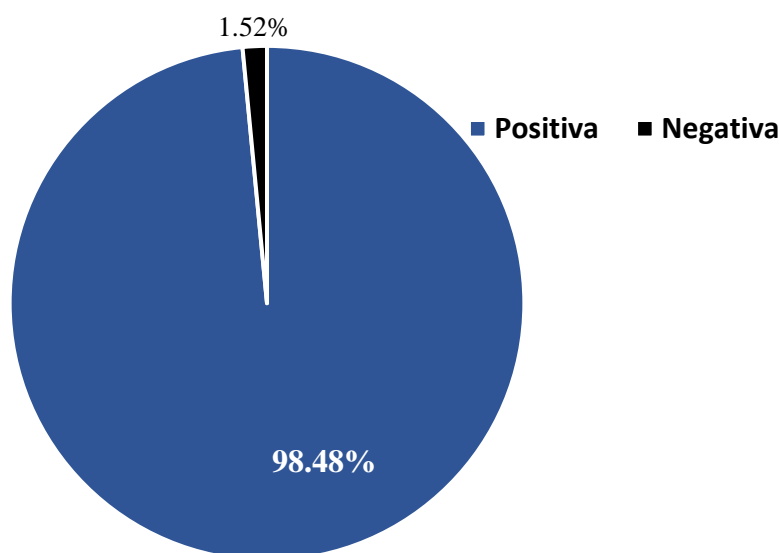
La información recopilada de los registros de laboratorio y los resultados de los análisis fueron procesados en Excel y SPSS Statistics, el informe final se realizó en Word 2016 y PowerPoint 2016 para la presentación.

8. Operacionalización de variables

Variable	Subvariable	Indicador	Valor	Criterio
Carbapenemasa		Imipenem Meropenem	Halo< 22mm Halo<21mm	Carbapenemasa
	Fenotipo Metallo-carbapemasa	EDTA	Sinergia	Positivo Negativo
Genotipo	NDM	BlaNDM	512 pb	Positivo Negativo
Resistencia Antibiótica	Halo	Medición	CEP< 14mm FEP< 18mm CEC< 14mm CXM< 14 mm CRO< 19 mm FOX< 14 mm IMP< 19mm MEM< 19 mm GEN < 12 mm CTX< 22 mm CHL< 12 mm	Resistente Sensible

9. Análisis y discusión de resultados

Gráfico N° 1. Test de sinergia con EDTA de *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* aisladas de procesos infecciosos en paciente del Hospital Antonio Lenin Fonseca de la ciudad de Managua en los meses de Junio a Octubre- 2017.



Se realizó la detección fenotípica de enzimas carbapenemasas tipo Metallo- β -lactamasas, a 13 aislamientos por medio del test de sinergia con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), dando un resultado 98.48 % positivo y el 1.52% fue negativo por lo que es probable que esté presente otro tipo mecanismo de resistencia.

Estos resultados concuerdan con un estudio realizado por Cerda, Martinez, & Perez, (2016) en el Hospital Aleman Nicaraguense, donde aislaron 249 cepas de las 45 de estas fueron resistentes a los carbapenemicos, 68.90% correspondía a *K. pneumonie*, el 8.90% a *E.coli* y el 2.2% a otras enterobacterias a las cuales se les realizó la prueba de sinergismos con APB y EDTA, donde Metallo- β -lactamasas se presentó con mayor frecuencia representado por el 91%.

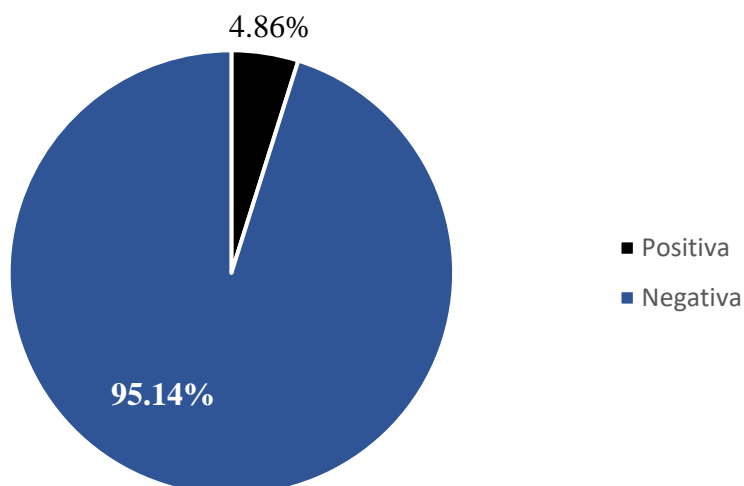
Así mismo un estudio realizado por Ortiz. et.al. en nicaragua (2014) donde fueron analizados 13 aislamientos, 12 eran de *Klebsiella pneumoniae* y 1 de *Escherichia coli*, se encontró que todas mostraron sinergismo con EDTA.

Las Carbapenemasas son enzimas capaces de hidrolizar los antibióticos Carbapenémicos. La producción de estas enzimas parece ser la causa más ampliamente distribuida de resistencia a carbapenémicos ya que su distribución en distintas especies bacterianas es extensa. Ariza & León (2013)

Los resultados obtenidos en la detección fenotípica por sinergismo con EDTA realizado en el Hospital Antonio Lenin Fonseca demostraron una mayor frecuencia de Metallo- β -Lactamasa, aunque según la literatura las carbapenemasas de tipo Serino - β -Lactamasa se encuentran presente en más del 50% de los aislamientos de enterobacterias a nivel mundial. A diferencia de lo citado anteriormente estudios realizados en Nicaragua en el año 2015 y 2016 en hospitales de la ciudad de Managua, en donde se realizó la detección fenotípica para carbapemasa evidenciaron una alta prevalencia de Metallo- β -Lactamasa.

Por otro lado, la reciente aparición de NDM se está convirtiendo en la carbapenemasa más amenazante, debido a su prolífica diseminación y su habilidad para hidrolizar todos los β lactámicos. Gabriel. et. al (2010)

Gráfico 2. Prevalencia del gen blaNDM *Klebsiella pneumoniae* aisladas de procesos infecciosos en paciente del Hospital Antonio Lenin Fonseca de la ciudad de Managua en los meses de Junio a Octubre- 2017.



El gráfico muestra la Prevalencia del gen blaNDM, determinada a través del método de Reacción en Cadena de la Polimerasa, en donde de 54 cepas aisladas de *Klebsiella pneumoniae*, 10 de ellas cumplieron con los criterios de inclusión, de las cuales 9 presentaron el gen blaNDM, lo que muestra una prevalencia del 4.86%

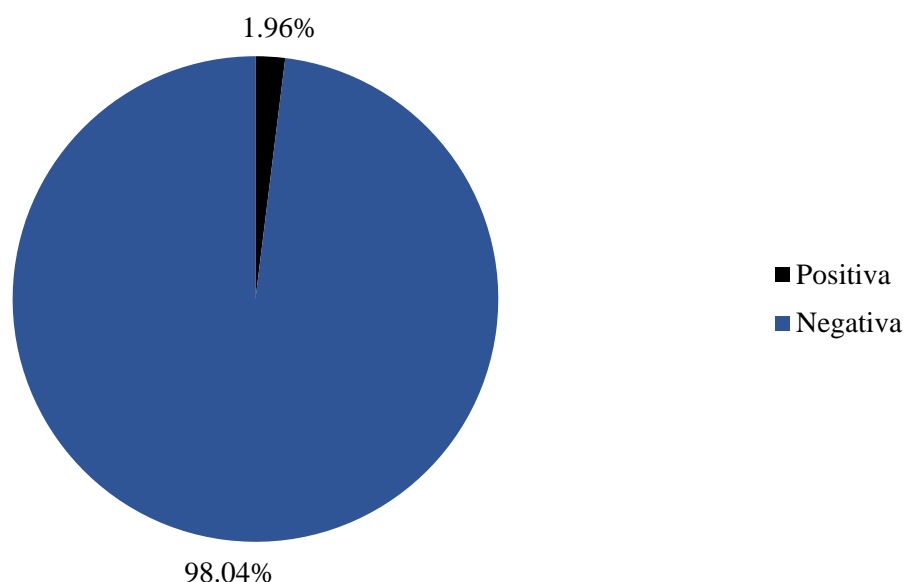
Este resultado difiere de un estudio realizado por Chinchilla et. al (2013) en la ciudad de Guatemala, en donde se aislaron 58 cepas de pacientes de los Hospitales Privados del Grupo MEDAX y 60 cepas almacenadas en el Laboratorio Nacional de Salud de Guatemala con un total de 118 cepas, el 58% fueron *E. coli* y el 42% fueron *K. pneumoniae*, en donde se encontró una prevalencia 14.16% de *K. pneumoniae* que presentaban el gen blaNDM.

En otro estudio Oscar. A. et al (2016) realizaron una investigación en el Hospital Alemán Nicaragüense en donde se analizaron 249 cepas, de la cuales, 45 eran resistentes a los carbapenémicos, en 21 cepas fue identificado el blaNDM, el 66% pertenecía a *Klebsiella pneumoniae* con una prevalencia del 12%, esto concuerdan con nuestros datos debido a que la bacteria *K. pneumoniae* presento la mayor prevalencia.

Si bien los resultados obtenidos pertenecen a un solo centro y la situación epidemiológica es particular para las distintas instituciones del país, es importante notar que la prevalencia blaNDM en aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a carbapenemes, resultó de 4.86% lo cual sugiere un brote de *K. pneumoniae* productora de NDM-1 posiblemente esta transmisión fue dada al compartir la misma área de hospitalización entre los pacientes infectados cabe destacar que *Klebsiella pneumoniae* es un patógeno oportunista que adquiere con cierta facilidad plásmidos que en la mayoría de los casos, portan genes que codifican resistencia para múltiples antimicrobianos, siendo repetidamente asociado a infecciones adquiridas tanto en la comunidad como a nivel hospitalario, debido a que este microorganismo está muy bien adaptado al ambiente del hospital y sobrevive mucho tiempo en las manos del personal de salud, lo que facilita su transmisión entre personas.

La propagación de aislamientos productores de carbapenemasas en diferentes países, ha aumentado la problemática global de la resistencia antibacteriana; especialmente desde el año 2008, con la alerta a nivel mundial de aislamientos de *E. coli* y *K. pneumoniae* productores de NDM, La importancia de la detección de esta nueva Carbapenemasa consiste en el riesgo de transmisión de un mecanismo de resistencia que produce falla terapéutica con la mayoría de los antimicrobianos disponibles actualmente.

Grafica 3. Prevalencia del gen blaNDM en *Escherichia coli* de procesos infecciosos en paciente del Hospital Antonio Lenin Fonseca de la ciudad de Managua en los meses de Junio a Octubre- 2017.



El grafico muestra la Prevalencia del gen blaNDM, determinada a través del método de Reacción en Cadena de la Polimerasa, en donde de 98 cepas aisladas de *Escherichia coli*, 3 cumplieron con los criterios de inclusión, siendo 2 de ellas portadoras del gen blaNDM, lo que muestra una prevalencia del 1.96%.

El análisis genotípico muestra una baja prevalencia del gen blaNDM para *Escherichia coli*, resultado que concuerda con la investigación de Oscar. A. et al (2016) en la ciudad de Managua en cual reflejo que *E. coli* tenía una prevalencia del 1.2%.

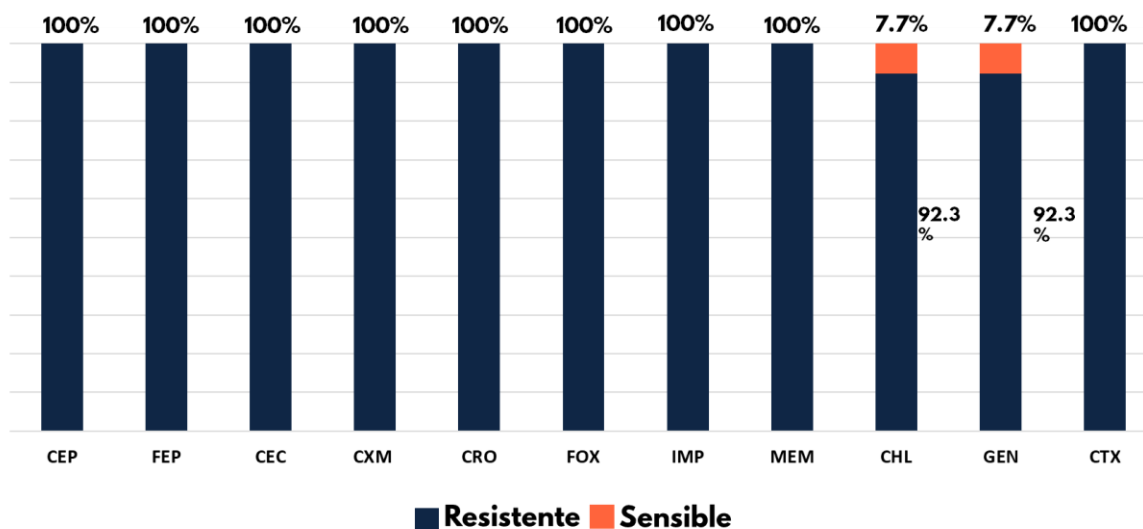
En otro estudio realizado por Chinchilla et. al (2013). En la evaluación genotípica se observó que la de carbapenemasas de tipo NDM fue mayor en *K. pneumoniae* que en *E. coli*, y podemos relacionarlo con los resultados obtenidos en esta investigación.

Escherichia coli, presentó menor prevalencia en la investigación, el hecho de que tenga una prevalencia baja, no significa que no tenga relevancia ya que *E. coli* es el microorganismo más frecuentemente implicado en bacteriemias nosocomiales y comunitarias.

E. coli tiene la capacidad de intercambiar material genético por medio de elementos tales como plásmidos y bacteriófagos, como respuesta de adaptación a entornos nuevos y adversos. Estos elementos genéticos contribuyen a la aparición de agentes patógenos con mayor virulencia, supervivencia ambiental y resistencia a los antibióticos.

Las enterobacterias productoras de carbapenemasas tipo NDM se han convertido en un reto importante en los servicios de atención de salud ya que están asociadas con altas tasas de morbilidad y mortalidad, especialmente entre pacientes con hospitalización prolongada, enfermedad grave y exposición a procedimientos invasivos. En *E. coli* esta enzima ya ha sido documentada en otros como Nicaragua, Costa Rica, Perú y Argentina.

Grafica 4. Perfil de resistencia de aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* aisladas de procesos infecciosos en paciente del Hospital Antonio Lenin Fonseca de la ciudad de



En el perfil resistencia se encontró que las 13 cepas fueron resistentes a los antibióticos β -lactámicos; Cefalotina, Cefepime, Cefaclor, cefuroxima, ceftriaxona, Cefoxotín, Cefotaxima y también a los carbapenémicos Imipenem, meropenem, 12 cepas resultaron resistentes a Cloranfenicol y Gentamicina.

Los resultados del estudio concuerdan con el estudio de (Cerde, Martinez, & Perez, 2016) realizado en el Hospital Alemán Nicaragüense donde se encontró que las 13 cepas de las cuales 12 pertenecieron a *K. pneumoniae* y 1 a *E. coli*, todas ellas presentaron resistencia a la mayoría de los antibióticos β -lactámicos, carbapenémicos y gentamicina.

Otro estudio realizado por (Ortiz, Rodríguez, & Urbina, 2014) en el Hospital Antonio Lenin Fonseca en año 2014, también encontró que la mayoría de sus cepas, presentaban resistencia a la mayoría de los antibióticos, excepto a colistin.

El uso incorrecto de los antibióticos puede englobar diferentes causas como la prescripción innecesaria, retraso en su administración en pacientes en estado crítico, utilización de antibióticos de amplio espectro con demasiada generosidad, o uso incorrecto de antibióticos

de espectro reducido, empleo de dosis de antibiótico inferior o superior a la adecuada, duración del tratamiento antibiótico demasiado corta o demasiado prolongada y el tratamiento antibiótico no ajustado según los datos del cultivo microbiológico, las bacterias productoras de carbapenemasas ocasionan un problema de gran magnitud porque la presencia de estas enzimas inhibe a los carbapenémicos y hace a la bacteria resistente a todos los demás β -lactámicos, excepto aztreonam en el caso de las metalo- β -lactamasas. Por tanto quedan pocos antibióticos eficaces y por ello surge la necesidad de combinar antimicrobianos por dos posibles ventajas: el efecto sinérgico y la prevención de resistencias.

Aunque en el perfil de sensibilidad no se testeó aztreonam debido a que el hospital no fue abastecido de este. Algunos estudios recomiendan el uso de este ya que es resistente a la hidrólisis de las metalo- β -lactamasas, así también las gliciliclinas (Tigeciclina) y las polimixinas (Colistin) han mostrado actividad *in vitro* contra enterobacterias portadoras de NDM, sin embargo, hay que partir de la base que aquellos aislamientos portadores de NDM pueden también producir otras enzimas de resistencia que podrían hidrolizar estos y por tanto producir falla terapéutica.

10. Conclusiones

1. En la prueba fenotípicas para la detección de carbapenemasas, se demostró a través de sinergismo con ácido etilendiaminotetraacético que 98.48 % de las cepas con resistencia a los carbapenémicos presentaban, enzimas carbapenemasas tipo Metallo- β -lactamasas.
2. En el análisis genotípico para la detección del gen New Delhi Metallo, mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa, se demostró una prevalencia 4.86% para *Klebsiella pneumoniae* y 1.96%. para *Escherichia coli*.
3. En el perfil resistencia se encontró que las 13 cepas fueron resistentes a los antibióticos β -lactámicos; Cefalotina, Cefepime, Cefaclor, cefuroxima, ceftriaxona, Cefoxotín, Cefotaxima y también a los carbapenémicos Imipenem, meropenem, 12 cepas resultaron resistentes a Cloranfenicol y Gentamicina.

11.Recomendaciones

1. Al Ministerio de salud mantener la vigilancia activa a la resistencia antimicrobiana y también abastecer y capacitar los laboratorios de materiales necesarios para la detección fenotípica de mecanismo de resistencia.
2. Al hospital para que realice estudios, para la búsqueda de carbapenemasas en las cepas aisladas en el laboratorio
3. A la UNAN-MANAGUA Polisal para que promueva más estudios de genotipificación bacteriana, para conocer de manera más detallada la resistencia a los carbapenémicos que afecta a nuestro país.

12. Bibliografía

1. AEP. (2015). *Pediamécum*. (C. d. Pediatría, Ed.) Recuperado el 13 de Agosto de 2017, de http://pediamecum.es/wp-content/farmacos/Imipenem_Cilastatina.pdf
2. Aguayo A. et al. (2016). *Colistín en la era post-antibiótica*. Chile: Rev Chilena Infectolo.
3. Arbizu O. et al. (2016). *New Delhi Metallo- β -lactamase (NDM) in Enterobacteriaceae species isolated from hospitalized patients, Managua Nicaragua*. Managua.
4. Ariza, B., & León, A. (2013). *carbapenemasa nueva delhi tipo 1 (ndm): descripción fenotípica, epidemiológica y tratamiento*. Montevideo: Laboratorio Actual .
5. Betancor, L., Gadea, M., & Flores, K. (2006). Genética bacteriana. En *Temas de Bacteriología y Virología Médica* (págs. 59-79). Montevideo: FEFMUR.
6. Cano, H. J., & Contreras., A. R. (2013). Aspectos básicos de los mecanismos de resistencia bacteriana. *Revista Médica MD*.
7. CARA. (2015). *canadian antimicrobial resistance alliance*. (c. a. alliance, ed.) Recuperado el Julio de 2017
8. Cerda, H., Martinez, W., & Perez, A. (2016). *Genes productores de enzimas carbapenemas tipo metalo-b-lactamasa, kpc y oxa mediante la tecnica de pcr convencional en enterobacterias aisladas de pacientes internados en salas del hospital aleman nicaraguense en el periodo de agosto 2015-Octubre 2016*. Managua: UNAN.
9. Chinchilla, A., Tomas, B., & Morales, R. (2013). *detección de carbapenemasas tipo ndm-1 y kpc-2 en enterobacterias blee+: evaluación fenotípica con confirmación genotípica*. Guatemala: USAC.
10. Delgado, C. R., Montenegro, J. J., Chiappe, A., & al, e. (2017). *klebsiella pneumoniae nueva delhi metalo-betalactamasa en el hospital nacional dos de mayo. lima, Perú*. Lima: Rev Peru Med Exp Salud Publica.
11. Gabriel, L. H., Ian, G., Andrea, E., & Pilar, R. P. (2010). *Manejo y prevención de las Enterobacteriaceae productoras de carbapenemasas*. Buenos Aires: cocemi.
12. García, A. P., & Rodríguez, F. M. (2010). *Enterobacterias*. Mexico DF: 2010.

13. Gobernado, M. (2010). Meropenem. Aspectos microbiológicos. *Revista Española Quimioter*, 6-17.
14. Gobernado, M., & Acuña, y. C. (2007). Ertapenem. *Revista Española QUIMIOTERAP*, 277-299.
15. Guevara, A., Gamboa, A., Machado, M., & Vera, M. (2010). *Evaluación del ácido etilendiaminotetraacético y del mercaptoacético de sodio en la detección de metalo β -lactamasas en Pseudomonas aeruginosa mediante la técnica del disco combinado*. Caracas : Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología.
16. HPA. (3 de julio de 2009). *Health Protection Agency*. Obtenido de <http://webarchive.nationalarchives.gov.uk/20140714101848/http://www.hpa.org.uk/hpr/archives/2009/news2609.htm>
17. IDT. (s.f.). Reacción en cadena de la polimerasa – PCR. *IDT Biologika*. Dessau-Rosslau.
18. INCIENSA. (2014). *Primer aislamiento MBL-NDM positivo en Costa Rica*. San jose, Costa Rica.
19. INCIENSA. (2014). *Segundo caso importado de infección por enterobacteria carbapenemasa tipo Metalobactelactamasa New Delhi (MBL-NDM) positiva en Costa Rica, julio 2014*. San jose: Centro Nacional de Referencia de Bacteriología.
20. INEI-ANLIS. (2013). *Emergencia de carbapenemasa tipo NDM en argentina*. Buenos aires: INEI-ANLIS.
21. López, A. M. (2011). *Microral*. Obtenido de <https://microral.wikispaces.com/3.+Gen%C3%A9tica+bacteriana>.
22. Moncada, M. V. (2014). *caracterización molecular de aislamientos de klebsiella pneumoniae portadores del gen bla ndm-1 procedentes de una unidad neonatal en un hospital de bogotá*. Bogota: UNC.
23. Moreno, K. (2013). *Carbapenémicos: tipos y mecanismos de resistencia bacterianos*. San José, Costa Rica.: revista medica de costa rica y centroamerica lxx.
24. Murray, P., Rosenthal, K., & Pfaller, M. (2013). *Microbiología médica*. Barcelona : Elsevier Inc.
25. Ortega, M. G. (2014). *determinación de carbapenemasas en aislamientos de escherichia coli y klebsiella sp. aisladas en el hospital general san juan de dios*.

-
26. Ortega, R. (Octubre de 2017). Test de sinergia con edta. Hospital Antonio Lenin Fonsenca.
 27. Ortiz, D., Rodríguez, M., & Urbina, J. (2014). *Identificación fenotípica de Enterobacterias productoras de carbapenemasa y genes que portan β -lactamasa de Espectro Extendido (BLEE), en cepas aislada de procesos infecciosos en los pacientes internos del Hospital Antonio Lenin Fonseca, en los meses de a.* MANAGUA: UNAN.
 28. Ovalle, M., Duarte, C., & al, e. (2014). *Circulación de Carbapenemasas tipo New Delhi Metallo- β -lactamasa (NDM), Colombia, 2011 a 2013.* Bogota: IQEN.
 29. Padilla, C. A., Dapena, J. D., Galisteo, E. M., & et al, e. (s.f.). *plasmídico, Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa. Aislamiento y caracterización electroforética de DNA.*
 30. Pasteran F. et al. (2012). *Emergence of NDM-1-producing.* Guatemala: Journal of Antimicrobial Chemotherapy.
 31. Pérez, A. M. (2017). *Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR).* Valencia: Universidad de Valencia.
 32. Puig, Y., V. L., & Apórtela, N. (2014). *SEROGRUPOS Y RESISTENCIA ANTIMICROBIANA DE CEPAS DE ESCHERICHIA COLI AISLADAS EN ALIMENTOS PROCEDENTES DE BROTES DE ENFERMEDADES DIARREICAS.* La Habana: Revista Cubana de Alimentación y Nutrición.
 33. Quesada, D. J. (2009). *CARBAPENEMES. Actualización Médica Periódica*, 1-6.
 34. Rodríguez, N., & Barrios, M. A. (2007). *REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) y otras técnicas moleculares en el estudio de afecciones dermatológicas .*
 35. Seija, V., & Vignoli, R. (2006). *Temas de bacteriología y virología médica.* Montevideo: FEFMUR.
 36. Sousa, L. D., Chacare, M., Cuaical, N., & Ashby, J. (2014). *Primer aislamiento de Escherichia coli productora de carbapenemasa tipo New Delhi a (NDM) en un hospital de Ciudad Guayana, Venezuela.* Guayana: Hospital Docente Asistencial Dr. Raúl Leoni Otero.

37. Suárez, C. J., Kattán, J. N., Guzmán, A. M., & Villegas, M. V. (2006). *Mecanismos de resistencia a carbapenems en P. aeruginosa, Acinetobacter y Enterobacteriaceae y estrategias para su prevención y control*. Cali: CIDEIM.
38. Tafur, J. D., Torres, J. A., & Villegas, M. V. (2008). *Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas*. Cali: CIDEIM.
39. UBA. (2015). *Genética Bacteriana y Mecanismos de la Transferencia Horizontal Genética*. Buenos Aires: Universidad de Buenos Aires.
40. WHONET. (2017). *protocolo de trabajo red whonet argentina*. Rosario, Argentina: WHONET.
41. WHONET. (2017). *protocolo de trabajo red whonet argentina*. Rosario, Argentina: WHONET.
42. Yong D. et al. (2009). *Characterization of a New Metallo- β -Lactamase Gene, blaNDM-1, and a Novel Erythromycin Esterase Gene Carried on a Unique Genetic Structure in Klebsiella pneumoniae Sequence Type 14*. Örebro, Suecia.

ANEXOS



UNIVERSIDAD
NACIONAL
AUTÓNOMA DE
NICARAGUA,
MANAGUA

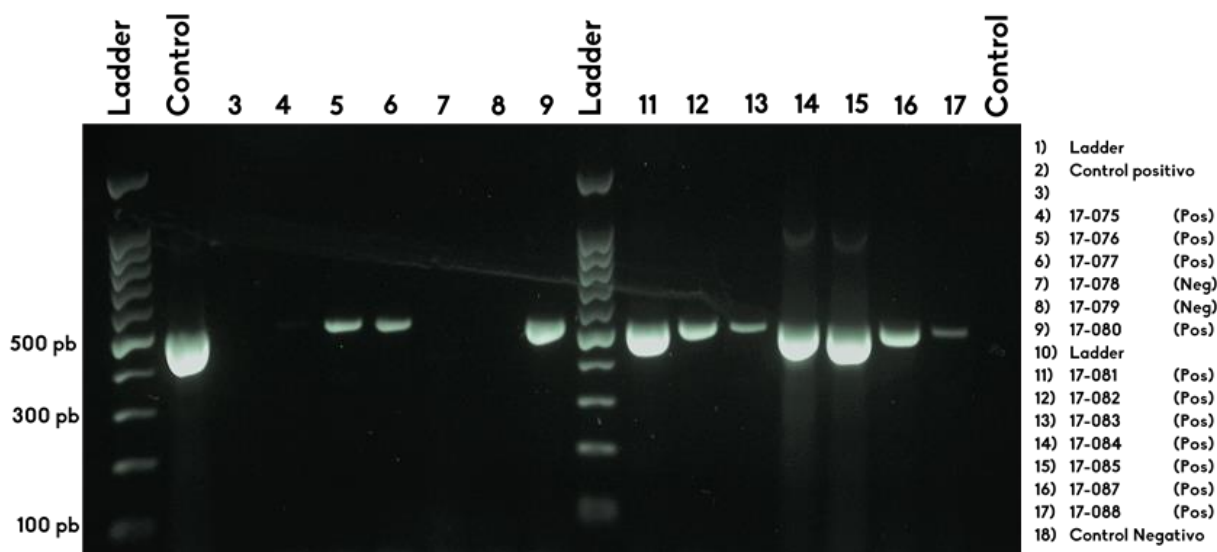
UNAN - MANAGUA

Instrumento de la recolección de la información

La presente ficha de trabajo tiene como objetivo la recopilación de datos referentes a la muestra del estudio Prevalencia del gen bla_{kpc} de *Klebsiella pneumoniae* resistente a Carbapenemasa, en cepas aisladas de cultivos realizados a Pacientes internos del Hospital Antonio Lenin Fonseca de la ciudad de Managua en el periodo de Junio a Octubre del 2017.

FICHA DE RECOLECIÓN DE INFORMACIÓN									
DATOS GENERALES									
Fecha de recolección de la muestra:									
N° trabajo de la muestra:					sexo:		Edad:		
Nombre del paciente:									
Tipo de muestra:					Exp:		Sala:		
Microorganismo aislado									
Genero:									
Especie:									
Mecanismo de resistencia									
			POSITIVO			NEGATIVO			
Metallo-b-lactamasa sinergia con EDTA									
KPC sinergia con APB									
oxicilinas: sin efecto de sinergia									
			FARMACO	S	R	FARMACO	S	R	
Antibiograma			OXA			CXM			
			AMP			IPM			
			CEP			MEM			
			CEC			AMC			
			CRO			TZP			
			CAZ			KF			
			CTX			CIP			
			FEP			SXT			
			FOX			COL			
			GEN			CHL			
			NAL			AMK			

Electroforesis en Gel de agarosa para la determinación de New Delhi Metalo.



Test de sinergia con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).



SINERGIA NEGATIVA



SINERGIA POSITIVA

Tabla N°1 Análisis fenotípico de aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* en

EDTA	Frecuencia	Porcentaje
Negativo	1	1.52
Positivo	12	98.48
Total	13	100,0

cepas remitidas del Hospital Antonio Lenin Fonseca en los meses de Junio a Octubre 2017

Tabla N°2 Análisis Genotípico de *Klebsiella pneumoniae* aisladas de procesos infecciosos en paciente del Hospital Antonio Lenin Fonseca de la ciudad de Managua en los meses de Junio a

NDM	Frecuencia	Porcentaje
Negativo	45	4.86
Positivo	9	95.14
Total	54	100,0

Octubre- 2017.

Tabla N°3 Análisis Genotípico de *Escherichia coli* aisladas de procesos infecciosos en paciente del

NDM	Frecuencia	Porcentaje
Negativo	98	1.96
Positivo	2	98.04
Total	54	100,0

Hospital Antonio Lenin Fonseca de la ciudad de Managua en los meses de Junio a Octubre- 2017

Tabla N°4 Perfil de aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* en cepas remitidas del Hospital Antonio Lenin Fonseca en los meses de Junio a Octubre 2017.

	Sensible		Resistente	
	Frecuencia	Porcentaje	Frecuencia	Porcentaje
CEP	0	0%	13	100%
FEP	0	0%	13	100%
CEC	0	0%	13	100%
CXM	0	0%	13	100%
CRO	0	0%	13	100%
FOX	0	0%	13	100%
IMP	0	0%	13	100%
MEM	0	0%	13	100%
CHL	1	7.7%	12	92.3%
GEN	1	7.7%	12	92.3%
CTX	0	0%	13	100%
COL	13	100%	0	0%

Presupuesto del proyecto

Nombre del artículo	Unidad de medida	Costo unitario
Guantes	Facilitado	-
Agar Mueller Hinton	Facilitado	-
Agar PSA	Facilitado	-
EDTA	Donado	-
Parafilm	Facilitado	-
Discos para antibiograma con Imipenem	2 paquetes	\$ 10 (Equivalente C\$ 303)
Discos para antibiograma con Meropenem	2 paquetes	\$ 10 (Equivalente C\$ 303)
Platos Petri	3 paquetes	C\$ 180
Agar MacConkey	1 frasco	\$ 70 (Equivalente C\$ 2,121)
Dreams Tap DNA Polimerase	1 kit	\$ 451 (Equivalente C\$ 13,665.3)
Costo total		16, 572.3